

抄 録

1) 他誌掲載論文

Seroprevalence of coxsackievirus A21 neutralizing antibodies in Yamagata, Japan between 1976 and 2019; coxsackievirus A21 has rarely affected young children

Tanaka W, Komabayashi K, Ikeda Y, Aoki Y, Itagaki T, Mizuta K

J Med Virol. 2022;94:2877-2881.

Although coxsackievirus A21 (CV-A21) has been associated with an acute respiratory infection (ARI) as well as poliomyelitis-like paralysis, reports of CV-A21 detection have been quite limited both globally and in Japan. CV-A21 strains were isolated from five sporadic pediatric cases with ARI in 2019 in Yamagata, Japan. Neutralizing antibodies (NT Abs) were then measured against CV-A21 using sera collected in 1976, 1985, 1999, 2009, and 2019 in Yamagata, to clarify the longitudinal epidemiology of CV-A21. The total Ab-positive rate in each year was 15.2% (35/233), 10.7% (30/281), 14.3% (28/196), 3.1% (7/236), and 1.3% (3/226), respectively. Ab-positive rates generally increased with age, especially between 1976 and 1999. Among the total Ab-positive cases, the Ab titers were relatively low; 50 cases belonged to the 1:8-1:16, 40 to 1:32-1:64, 12 to 1:128-1:256, and 1 to 1:1024< groups, respectively. No Ab-positive cases under the age of 10 were observed in any of the years analyzed. In conclusion, this study and previous works suggested that CV-A21 is a unique enterovirus, which is not transmitted readily among young children but causes sporadic ARI cases mainly among those ≥ 15 years of age in the community.

A hydroxypropyl methylcellulose plaque assay for human respiratory syncytial virus

Takumi-Tanimukaia Y, Yamamoto S, Ogasawara N, Nakabayashi S, Mizuta K, Yamamoto K, Miyata R, Kakuki T, Jitsukawa S, Sato T, Tsutsumi H, Kojima T, Takano K, Yokota S

J Virol Methods. 2022;304:114528.

Quantifying proliferative virus particles is one of the most important experimental procedures in virology. Compared with classical overlay materials, newly developed cellulose derivatives enable a plaque-forming assay to produce countable clear plaques easily. HEp-2 cells are widely used in plaque assays for human respiratory

syncytial virus (RSV). It is crucial to use an overlay material to keep HEp-2 cell proliferation and prevent RSV particles from spreading over the fluid. Among four cellulose derivatives, carboxymethyl cellulose sodium salt (CMC), hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), microcrystalline cellulose (MCC), and hydroxyethyl cellulose (HEC), we found that HPMC was the optimal overlay material because HPMC maintained HEp-2 cell proliferation and RSV infectivity. Although MCC was unsuitable for RSV, it assisted the plaque-forming by human metapneumovirus in TMPRSS2-expressing cells. Therefore, depending on the cells and viruses, it is necessary to use different overlay materials at varying concentrations.

A seroepidemiologic study of a measles outbreak, Yamagata Prefecture, Japan, 2017: the estimation of spreaders using serological assays in a measles elimination setting

Seto J, Aoki Y, Tanaka S, Komabayashi K, Ikeda T, Mizuta K

J Infect Chemother. 2022;28:1018-1022.

Introduction: In regions where the endemic measles virus has been eliminated, early detection of contagious patients is important for preventing the spread of measles and sustaining elimination. To investigate whether serological assays can be used for the estimation of highly infectious patients with measles, we performed a seroepidemiologic study of a measles outbreak in Yamagata Prefecture, Japan, in 2017.

Methods: We tested plaque reduction neutralization (PRN), IgG avidity, and gelatin particle agglutination (PA) assays in 31 patients with measles, subdivided into two super-spreaders, three spreaders, and 26 non-spreaders. Simultaneously, these results were compared with the cycle threshold (Ct) of a semi-quantitative real-time reverse transcription PCR for the measles virus from throat swab specimens.

Results: In the PRN assay, one super-spreader and two spreaders lacked protective antibodies. The IgG avidity assay showed that two super-spreaders and one spreader had low avidity. The PA assay indicated that two super-spreaders and two spreaders lacked protective antibodies. Comparison of the results of the three serological assays and Ct revealed that patients whose antibody titers were judged as low in the IgG avidity and PA assays showed low Ct (i.e., high viral load), whereas non-spreaders tended to show low viral load.

Conclusions: Our preliminary seroepidemiologic analysis of a population of 31 patients with measles suggests that PA and IgG avidity assays may be used for the identification of super-spreader/spreader candidates. However, further investigations are necessary to validate the robustness of these serological assays in detecting contagious measles cases.

Recombinant parechovirus A3 possibly causes various clinical manifestations, including myalgia; findings in Yamagata, Japan in 2019

Mizuta K, Itagaki I, Chikaoka S, Wada M, Ikegami T, Sendo D, Iseki C, Shimizu Y, Abe S,
Komabayashi K, Aoki Y, Ikeda T

Infect Dis. 2022;1-19.

Background: Parechovirus A3 was first reported in 2004 and has been recognized as a causative agent of mild and severe infections in children. Since we first reported an outbreak of adult parechovirus A3-associated myalgia in Yamagata, Japan in 2008, this disease has since been recognized across Japan, but has not yet been reported from other countries.

Aim: We analysed 19 cases of parechovirus A3 infections identified in Yamagata in 2019 to further clarify the epidemiology of this disease.

Methods: We performed phylogenetic analyses of parechovirus A3 isolates and analysed the clinical manifestations and the genomic clusters.

Results: There were two clusters, with cluster 2019B replacing 2019 A around October/November. Phylogenetic analysis revealed that 2019B cluster strains and Australian recombinant strains, which appeared between 2012 and 2013, were grouped in one cluster at non-structural protein regions, suggesting that the ancestor to these regions of 2019B cluster strains were Australian recombinant lineage strains. The strains from both clusters caused various infections in children including myalgia. These findings strongly support that parechovirus A3 strains cause myalgia and other paediatric infections irrespective of the virus strains involved, including recombinant strains.

Conclusions: We have reported repeatedly sporadic cases of myalgia and here showed that recombinant strains also cause myalgia. We hope our experiences will help better understand these infections and possibly result in detection of more cases in the world.

Analytical estimation of maximum fraction of infected individuals with one-shot non-pharmaceutical intervention in a hybrid epidemic model

Fujiwara N, Onaga T, Wada T, Takeuchi S, Seto J, Nakaya T, Aihara K

BMC Infect Dis. 2022;22:512.

Background: Facing a global epidemic of new infectious diseases such as COVID-19, non-pharmaceutical interventions (NPIs), which reduce transmission rates without medical actions, are being implemented around the world to mitigate spreads. One of the problems in assessing the effects of NPIs is that different NPIs have been

implemented at different times based on the situation of each country; therefore, few assumptions can be shared about how the introduction of policies affects the patient population. Mathematical models can contribute to further understanding these phenomena by obtaining analytical solutions as well as numerical simulations.

Methods and results: In this study, an NPI was introduced into the SIR model for a conceptual study of infectious diseases under the condition that the transmission rate was reduced to a fixed value only once within a finite time duration, and its effect was analyzed numerically and theoretically. It was analytically shown that the maximum fraction of infected individuals and the final size could be larger if the intervention starts too early. The analytical results also suggested that more individuals may be infected at the peak of the second wave with a stronger intervention.

Conclusions: This study provides quantitative relationship between the strength of a one-shot intervention and the reduction in the number of patients with no approximation. This suggests the importance of the strength and time of NPIs, although detailed studies are necessary for the implementation of NPIs in complicated real-world environments as the model used in this study is based on various simplifications.

Suitability of NIID-MDCK cells as a substrate for cell-based influenza vaccine development from the perspective of adventitious virus susceptibility

Hamamoto I, Takahashi H, Shimasaki N, Nakamura K, Mizuta K, Sato K, Nishimura H, Yamamoto N, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Nobusawa E

Microbiol Immunol. 2022;66:361-370.

The practical use of cell-based seasonal influenza vaccines is currently being considered in Japan. From the perspective of adventitious virus contamination, we assessed the suitability of NIID-MDCK cells (NIID-MDCK-Cs) as a safe substrate for the isolation of influenza viruses from clinical specimens. We first established a sensitive multiplex real-time PCR system to screen for 27 respiratory viruses and used it on 34 virus samples that were isolated by passaging influenza-positive clinical specimens in NIID-MDCK-Cs. Incidentally, the limit of detection (LOD) of the system was 100 or fewer genome copies per reaction. In addition to influenza viruses, human enterovirus 68 (HEV-D68) genomes were detected in two samples after two or three passages in NIID-MDCK-Cs. To further investigate the susceptibility of NIID-MDCK-Cs to adventitious viruses, eight common respiratory viruses were subjected to passages in NIID-MDCK-Cs. The genome copy numbers of seven viruses other than parainfluenza 3 decreased below the LOD by passage 4. By passaging in NIID-MDCK-Cs, the genome numbers of the input HEV-D68, 1×10^8 copies, declined to 102 at passage 3 and to under the LOD at passage 4, whereas those of the other six viruses were under the LOD by passage 3. These results implied that during the process of isolating influenza viruses with NIID-MDCK-Cs, contaminating viruses other than parainfluenza 3 can

be efficiently removed by passages in NIID-MDCK-Cs. NIID-MDCK-Cs could be a safe substrate for isolating influenza viruses that can be used to develop cell-based influenza vaccine candidate viruses.

山形県における時空間三次元地図を用いた新型コロナウイルス感染症流行可視化の取り組み

瀬戸順次, 鈴木恵美子, 山田敬子, 石川仁, 加藤裕一, 加藤丈夫, 山下英俊, 阿彦忠之,
水田克巳, 中谷友樹

日本公衆衛生雑誌. 2023;70:185-196.

目的 感染症の流行状況を的確に示すためには、時・場所・人の3つの情報の要約が求められる。本報告では、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）が山形県において「いつ・どこで・どのように」広がっているのかを可視化した COVID-19 時空間三次元マップ（時空間マップ）を用いて実施した公衆衛生活動の概要を紹介することを目的とした。

方法 山形県および山形市（中核市）のプレスリリース情報を基に感染者の疫学情報をリスト化し、無料統計ソフトを用いて時空間マップ（自由に回転、拡大・縮小が可能な3次元グラフィクスを含むhtmlファイル）を作成した。時空間マップの底面には、山形県地図を配置した。各感染者は、XY平面の居住地市町村（代表点から規定範囲でランダムに配置）とZ軸の発病日（推定を含む）の交点にプロットした。また、色分けにより、感染者の年齢群、感染経路を示した。さらに、県外との疫学的関連性を有する感染者には、都道府県名等を挿入した。完成した時空間マップは、山形県衛生研究所ホームページ上で公開し、随時更新した。

活動内容 2020年8月に時空間マップの公開を開始し、以降、山形県で経験した第六波までの流行状況を公開した。その中で確認された、第一波（2020年3～5月）から第五波（2021年7～9月）までに共通していた流行の特徴をまとめ、ホームページ上に掲載した。あわせて、その特徴を踏まえた感染対策（山形県外での流行と人の流れの増加の把握、飲食店クラスターの発生抑止、および家庭内感染の予防）を地域住民に提言した。2022年1月以降の第六波では、10歳未満、10代、そして子育て世代の30代の感染者が増加し、保育施設・小学校におけるクラスターも増えていたことから、これら施設においてクラスターが発生した際の家庭内感染の予防徹底を呼びかけた。

結論 時・場所・人の情報を含む COVID-19 流行状況をまとめた図を作成・公開する中で得られた気づきを基に、地域住民に対して具体的な感染対策を提言することができた。本報告は、自治体が公表している感染者情報を用いた新たな公衆衛生活動の方策を示した一例と考えられる。

山形県における結核菌ゲノム解析を用いた結核分子疫学調査

瀬戸順次, 和田崇之, 村瀬良朗, 三瓶美香, 下村佳子, 細谷真紀子, 水田克巳, 御手洗聡,
阿彦忠之

感染症学雑誌. 2023;97:6-17.

背景：本邦では結核菌ゲノム解析と実地疫学を組み合わせた積極的結核疫学調査の有用性評価は行われていない。

方法：2009～2020年の山形県における反復配列多型（VNTR）分析に基づいた網羅的な結核分子疫学調査結果により見出されたクラスターのうち、2020年の結核患者8人を含む8クラスター（19人）を対象に結核菌ゲノム比較を実施し、保健所の実地疫学調査結果と併せて評価した。

結果：結核菌ゲノム比較の結果、近縁株（一塩基多型5カ所以内、もしくは6～12カ所かつ患者間に疫学的関連性を確認）は19株中9株（47.4%）に留まり、半数の4クラスターにのみ近縁株が含まれた。また、近縁株患者9人中6人（66.7%）で患者間の疫学的関連性が見出されていた一方、分離された菌が患者間の最近の結核感染伝播を示唆しない非近縁株（一塩基多型13カ所以上）であった10人は、全例が疫学的関連性不明であった（ $p < 0.01$ ）。

結論：高精細な識別能を有する結核菌ゲノム解析は、VNTR分析によりクラスターを形成した菌株から、患者間の疫学的関連性を強く示唆する近縁株を選別することができた。その特長は、保健所の感染伝播経路調査に要する人的・時間的資源を必要な結核患者に集中させることを可能とし、効率的かつ高精度の積極的結核疫学調査に貢献するものと考えられた。

Measles Outbreak Response Activity in Japan, and a Discussion for a Possible Strategy of Outbreak Response Using Cycle Threshold Values of Real-Time Reverse Transcription PCR for Measles Virus in Measles Elimination

Seto J, Aoki Y, Komabayashi K, Yamada K, Ishikawa H, Ichikawa T, Ahiko T, Mizuta K

Viruses. 2023;15:171.

Measles is a highly contagious, but vaccine-preventable disease caused by the measles virus (MeV). Although the administration of two doses of measles vaccines is the most effective strategy to prevent and eliminate measles, MeV continues to spread worldwide, even in 2022. In measles-eliminated countries, preparedness and response to measles outbreaks originating from imported cases are required to maintain elimination status. Under these circumstances, real-time reverse transcription (RT) PCR for MeV could provide a diagnostic method capable of

strengthening the subnational capacity for outbreak responses. Real-time RT-PCR can detect MeV RNA from patients with measles at the initial symptomatic stage, which can enable rapid public health responses aimed at detecting their contacts and common sources of infection. Furthermore, low cycle threshold (Ct) values (i.e., high viral load) of throat swabs indicate high infectiousness in patients with measles. The high basic reproduction number of measles suggests that patients with high infectiousness can easily become super-spreaders. This opinion proposes a possible strategy of rapid and intensive responses to counter measles outbreaks caused by super-spreader candidates showing low Ct values in throat swabs. Our strategy would make it possible to effectively prevent further measles transmission, thereby leading to the early termination of measles outbreaks.

Antiviral susceptibilities of distinct lineages of influenza C and D viruses

Takashita E, Murakami S, Matsuzaki Y, Fujisaki S, Morita H, Nagata S, Katayama M, Mizuta K, Nishimura H, Watanabe S, Horimoto T, Hasegawa H

Viruses. 2023;15:244.

The emergence and spread of antiviral-resistant influenza viruses are of great concern. To minimize the public health risk, it is important to monitor antiviral susceptibilities of influenza viruses. Analyses of the antiviral susceptibilities of influenza A and B viruses have been conducted globally; however, those of influenza C and D viruses are limited. Here, we determined the susceptibilities of influenza C viruses representing all six lineages (C/Taylor, C/Yamagata, C/Sao Paulo, C/Aichi, C/Kanagawa, and C/Mississippi) and influenza D viruses representing four lineages (D/OK, D/660, D/Yama2016, and D/Yama2019) to RNA polymerase inhibitors (baloxavir and favipiravir) by using a focus reduction assay. All viruses tested were susceptible to both drugs. We then performed a genetic analysis to check for amino acid substitutions associated with baloxavir and favipiravir resistance and found that none of the viruses tested possessed these substitutions. Use of the focus reduction assay with the genotypic assay has proven valuable for monitoring the antiviral susceptibilities of influenza C and D viruses as well as influenza A and B viruses. Antiviral susceptibility monitoring of all influenza virus types should continue in order to assess the public health risks posed by these viruses.

Another advantage of multi-locus variable-number tandem repeat analysis that can putatively subdivide enterohemorrhagic Escherichia coli 0157 strains into clades by maximum a posteriori estimation

Hirai S, Yokoyama E, Ando N, Seto J, Hazama K, Enomoto K, Izumiya H, Akeda Y, Ohnishi M

PLoS One. 2023;18:e0283684.

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 (O157) strains can be subdivided into clades based on their single-nucleotide polymorphisms, but such analysis using conventional methods requires intense effort by laboratories. Although multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA), which can be performed with low laboratory burden, has been used as a molecular epidemiological tool, it has not been evaluated whether MLVA can be used the clade subdivision of O157 strains like it can for that of other pathogenic bacteria. This study aimed to establish a method for subdividing O157 strains into clades using MLVA data. The standardized index of association, ISA, for O157 strains isolated in Chiba prefecture, Japan (Chiba isolates) revealed the presence of unique tandem repeat patterns in each major clade (clades 2, 3, 7, 8, and 12). A likelihood database of tandem repeats for these clades was then constructed using the Chiba isolates, and a formula for maximum a posteriori (MAP) estimation was constructed. The ratio of the number of O157 strains putatively subdivided into a clade by MAP estimation from MLVA data relative to the number of O157 strains subdivided using single-nucleotide polymorphism analysis (designated as the concordance ratio [CR]) was calculated using the Chiba isolates and O157 strains isolated in Yamagata prefecture (Yamagata isolates). The CRs for the major Chiba and Yamagata isolate clades, other than clade 2, were 89%-100%. Although the CR for clade 2 Chiba isolates was >95%, that of the Yamagata isolates was only 78.9%. However, these clade 2 CRs were not significantly different from one another, indicating that clade 2 strains can be subdivided correctly by MAP estimation. In conclusion, this study expands the utility of MLVA, previously applied predominantly for molecular epidemiological analysis, into a low-laboratory-burden tool for subdividing O157 strains into phylogenetic groups.

Longitudinal antigenic and seroepidemiological analyses of parechovirus A1 in Yamagata, Japan

Mizuta K, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Sasaki M, Komabayashi K, Ikeda Y, Aoki Y, Matsuzaki Y

J Med Virol. 2023;95:e28696.

To investigate the antigenic changes in parechovirus 1 (PeVA1), seroepidemiological analyses were performed against the Harris strain (Harris), isolated in 1956, and PeVA1/Yamagata.JPN/2021-4785, isolated in 2021, using immune sera and 207 and 237 human serum specimens collected in 2021 and 1976, respectively. Although rabbit immune sera showed the highest neutralization antibody (NT-Ab) titers against the immunized viruses at 1:12 800-1:102 400, they were cross-reactive at 1:400-1:800. All 62 Yamagata isolates obtained between 2001 and 2021 (Yamagata strains), belonging to phylogenetic lineage 1B, reacted more strongly (mostly 4-64 times) to antiserum

against PeVA1/Yamagata.JPN/2021-4785 than to antiserum against Harris, belonging to phylogenetic lineage 1 A. Human serum specimens obtained in 2021 showed higher NT-Ab titers against PeVA1/Yamagata.JPN/2021-4785, whereas those obtained in 1976 had similar NT-Ab titers against both strains. These findings suggested that Yamagata strains and Harris were antigenically cross-reactive, although there were differences. There are still high NT-Abs titers present against Harris in 2021 in particular, indicating that PeVA1 has been in circulation with high immunity in the population. In conclusion, this study suggested that PeVA1 has been endemically perpetuated with only minor antigenic changes as well as with high immunity over several decades in the community.

ドクササコに含有される有毒成分の精製および多成分同時分析法に関する研究

石田恵崇, 大内仁志, 菅敏幸, 篠原秀幸, 中島克則, 長岡由香

食品衛生学雑誌. 2022;63:79-84.

ドクササコの有毒成分であるアクロメリン酸 A, B およびクリチジンの 3 成分について, それぞれキノコ子実体から単離精製する手法について検討を行った. シリカゲル, ODS, イオン交換樹脂を固定相としたカラムクロマトグラフィーおよび分取 TLC を組み合わせることにより各成分を高純度で得ることに成功した. 続けて, 得られた精製物を用いて LC-MS/MS の測定条件を最適化し, 多成分同時分析法を新規開発した. 本分析法の精度を確認するため, 添加回収試験を実施したところ, 回収率が 80.8-112.4%, 併行精度が 1.4-3.8% と良好な結果が得られ, 定量限界はいずれの成分も 0.25 µg/g と推定された. 以上を踏まえ, ドクササコ中毒発生時, 本分析法により原因キノコを迅速かつ高精度に特定可能であると判断した.

2) 学会発表

1976年から2019年の山形におけるコクサッキーウイルス A21型の血清疫学

水田克巳

第63回日本臨床ウイルス学会, 2022年6月18-19日, 於東京

【目的】コクサッキーウイルス A21 (CVA21)の検出報告は 1980-2021 年に日本国内で 30 例(山形の 2019 年の 5 例含む)であり, 国外からの報告も稀である.我々は, 2019 年 9-10 月に, 急性気道感染症の小児患者 5 名から CVA21 を山形県で初めて分離した(Jpn J Infect Dis.2021;74:172-4)ため, 今回, 山形県民の CVA21 中和抗体保有状況を調査することにした.

【方法】CVA21 山形分離株を抗原とし、1976・1985・1999・2009・2019 年に感染症流行予測調査事業のために採取された血清を段階希釈して混合・反応させ、RD-18S 細胞に接種して抗体価を測定した。

【結果と考察】年別の抗体陽性率は、それぞれ 15.2% (35/233), 10.7% (30/281), 14.3% (28/196), 3.0% (7/236), 1.3% (3/226)であった。年齢層別にみると、陽性率は年齢とともに上昇傾向(特に 1976-1999 年)にあった。全体を通じ、10 歳未満で抗体保有者はおらず、10 歳代の抗体保有者も少数であった。イギリスや日本で若年者の抗体保有率が低く年齢とともに上昇したという同様の報告があり、CVA21 の検出報告は少年刑務所・自衛隊・高校生などからなされている。今回のデータとこれらの報告から、一般的にエンテロウイルス感染症は小児の感染症と考えられているが、CVA21 は小児より年齢が高い世代において感染症や集団感染をおこしやすいウイルスであることが示唆された。

[非会員研究協力者:板垣勉(山辺こどもクリニック), 田中和佳, 駒林賢一, 池田陽子, 青木洋子(山形衛研)] 本研究は、東北乳酸菌研究会の支援を受けて実施された。

地方衛生研究所における急性脳炎・脳症及び急性弛緩性麻痺の病原体検査の状況について

四宮博人, 山下育孝, 水田克巳, 高崎智彦, 貞升健志, 皆川洋子, 田中義人, 多屋馨子, 青木紀子

第63回日本臨床ウイルス学会, 2022年6月18-19日, 於東京

急性脳炎・脳症及び急性弛緩性麻痺(以下、AFP)は 5 類感染症全数把握疾患であり、届出基準に病原体検査は必須ではないため、原因病原体については必ずしも十分に捉えていないことも多い。地方衛生研究所(以下、地衛研)におけるこれらの神経系疾患の病原体検査の実態を明らかにし、病原体不明急性脳炎・脳症・AFP の病原体検索を目指すことを目的に、これらの病原体検査について調査を実施した。多くの地衛研において、急性脳炎・脳症(5 類)届出症例の検査、及び病原体定点からの検体に「脳炎・脳症」と記載されたものについて病原体検査が実施されていた。2017 年～2019 年の急性脳炎・脳症届出症例の 72.7%について何らかの病原体検査が実施されており、病原体としては 15 種類程度の検査が実施され(多い順に、エンテロウイルス, HSV-1,2, HHV6,7, ヒトパレコウイルス, ライノウイルス, アデノウイルス, ムンプスウイルス, インフルエンザウイルス, VZV, CMV, ロタウイルス, RS ウイルス, ヒトメタニューモウイルス, パルボウイルス, ノロウイルスなど), 地衛研で検査された 1,687 症例中の 47.9%から何らかの病原体が検出されていた。一方、AFP についても、2018 年～2019 年に届出のあった症例について、病原体検査された症例数と陽性症例数について調査し、地衛研で病原体の検索がされた 86 症例からのべ 140 のウイルスが検出されており、コクサッキーウイルス, ライノウイルス, EV-D68, EBV, CMV, HHV6,7 の検出が多かった。EV-D68 は 22 症例(25.6%)から検出され、大部分は鼻咽頭検体から検出されていた。今後の治療や予防・原因究明に役立てるためには、正確な臨床情報と疫学情報のさらなる把握及び病原体検索の実施、そして臨床・検査側双方のコミュニケーションが必要と考えられる。

1976 年から 2019 年の山形におけるコクサッキーウイルス A21 型の血清疫学

水田克巳，田中和佳，駒林賢一，池田陽子，青木洋子，板垣勉

第 74 回日本細菌学会東北支部総会，2022 年 8 月 22-23 日，於福島

【背景】コクサッキーウイルス A21 (CVA21)の検出報告は 1980-2021 年に日本国内で 30 例(山形の 2019 年の 5 例含む)しかなく，国外からの報告も稀である．我々は，2019 年 9-10 月に，急性気道感染症の小児患者 5 名から CVA21 を山形県で初めて分離した(Jpn J Infect Dis.2021;74:172-4)ため，今回，山形県民の CVA21 中和抗体保有状況を調査することにした．

【方法】CVA21 山形分離株を抗原とし，1976・1985・1999・2009・2019 年に感染症流行予測調査事業のために採取された血清を段階希釈して混合・反応させ，RD-18S 細胞に接種して中和抗体価を測定した．

【結果】年別の抗体陽性率は，それぞれ 15.2% (35/233)，10.7% (30/281)，14.3% (28/196)，3.0% (7/236)，1.3% (3/226)であった．年齢層別にみると，陽性率は年齢とともに上昇傾向(特に 1976-1999 年)にあった．全体を通じ，10 歳未満で抗体保有者はおらず，10 歳台の抗体保有者も少数であった．

【考察】イギリスや日本で若年者の抗体保有率が低く年齢とともに上昇したという同様の報告があり，CVA21 の検出報告の多くは成人散発事例や少年刑務所・自衛隊・高校生の集団発生などからなされている．一般的にエンテロウイルス感染症は小児の感染症と考えられているが，今回のデータとこれらの報告から，CVA21 は高校生以上の世代において感染症や集団感染をおこしやすいウイルスであることが示唆された．

なお，本研究は，東北乳酸菌研究会の支援を受けて実施された．

山形県におけるゲノム解析を取り入れた結核分子疫学調査

瀬戸順次，和田崇之，村瀬良朗，下村佳子，細谷真紀子，御手洗聡，阿彦忠之

第 97 回日本結核・非結核性抗酸菌症学会総会，令和 4 年 7 月 1-2 日，於旭川

結核菌ゲノム解析を取り入れた結核分子疫学調査の有用性を評価した報告は少ない．われわれは，2020 年に山形県で登録された結核患者由来結核菌 49 株の反復配列多型 (VNTR) 分析を実施し，2006 年以降の菌株と VNTR クラスタ (クラスタ) を形成した 8 株が属した 8 クラスタ 20 株 (クラスタサイズ 2~3) のゲノム解析を実施した．結果，ゲノム比較が可能であった 7 クラスタ 17 株のうち 9 株 (52.9%) がゲノム解析において近縁株と判断され，由来患者 9 人のうち 6 人 (66.7%) は，クラスタ内の特定の患者との関連性が見出されていた．一方，ゲノム比較により近縁株ではないと判断された 8 株の由来患者は，全例が関連性不明だった．以上より，結核菌ゲノム解析は，保健所の感染伝播経路追究に係る人的・時間的資源を真に関連性を追究すべき結核患者に集中させることを可能にし，効率的かつ精度の

高い分子疫学調査を進めるうえでの強力な後ろ盾になると考えられた。

エクセル VBA を用いた新型コロナウイルス検査台帳システムの構築

瀬戸順次，水田克巳

第 81 回日本公衆衛生学会総会，2022 年 10 月 7-9 日，於甲府

【目的】保健所からの新型コロナウイルス検査依頼に係る事務処理の自動化のため，エクセル Visual Basic Application（以下，VBA）を用いた検査台帳システムを構築すること。

【方法】2020 年 4 月以降，PCR 検査担当者及び事務担当者の要望を聞き取りながら，検査依頼受付から結果報告に至るまでの事務処理の各工程を自動化する検査台帳システムを構築した。また新規検査・解析が導入された際には，随時，システムの仕様を変更した。

【結果】2020 年 4 月，新型コロナウイルス検査依頼の急増に伴い，感染症法に係る検査票様式を用いた紙ベースでの検査受付・結果報告という従来の方法が立ち行かなくなった。そこで，保健所からの依頼を，エクセル一覧表形式に変更した。併せて，エクセル VBA を用いたプログラミングにより，①検査対象者のイニシャル付与及び同一対象者複数検体確認，②PCR 検査リスト作成，③県庁報告用リスト作成，④PCR 検査結果取り込み，⑤保健所別報告書作成，及び⑥検査ノート貼付用シール作成，の 6 つの工程を，それぞれボタン 1 つで実施可能となるよう整備した。また，2021 年 1 月には変異株スクリーニング検査が開始されたため，N501Y，E484K，L452R 検査結果を保健所及び県庁に報告するための仕様を追加した。さらに，2021 年 5 月には，当所において新型コロナウイルスゲノム解析が可能となったため，当該解析結果入力に対応した仕様に修正した。以上の検査台帳システムの構築に際し，費用はかからなかった。また，システムの導入により，概算で 1 日あたり 1～2 時間の人的労力の節減につながった。

【結論】COVID-19 パンデミック下では，想像をはるかに超える数の PCR 検査をしながら，新たな検査・解析法に対応していく必要に迫られている。そのような中，検査台帳システムの構築は，検査員が検査・解析に集中できる環境の整備につながった点において，意義深いものであったと考えられた。また，自動化による労力の節減及び人的ミスの未然防止は，COVID-19 対応のみならず，公衆衛生行政における危機対応全般への汎用性があると思われる。従って，プログラミング技術を有する者の確保または育成が，今後の公衆衛生行政における効率的な危機対応を考えるうえでの一つの鍵になると考えられた。

山形県衛生研究所における 2019-2022 年の呼吸器ウイルスの検出状況

駒林賢一，佐々木美香，池田陽子，瀬戸順次，青木洋子，板垣勉，水田克巳

第 49 回山形県公衆衛生学会，2023 年 3 月 1 日，於山形

【緒言】山形県では感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律に基づき、感染症発生動向調査を実施している。この調査の一環として当所では呼吸器ウイルスの検索に力を入れており、病原体定点医療機関から提供された小児の呼吸器由来検体を中心に検査を行っている。本研究では風邪様症状の原因である呼吸器ウイルス 11 種類について、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の発生前後で検出状況を比較することを目的とした。

【方法】2019 年 1 月 4 日（第 1 週）から 2022 年 11 月 5 日（第 44 週）に山辺こどもクリニックを受診した患者から採取した呼吸器検体（鼻汁、咽頭拭い液、喀痰）を対象とした。

ヒトライノウイルス（HRV）及びヒトコロナウイルス（HCoV）4 種類（OC43, NL63, HKU1, 229E）は遺伝子検査により検体由来 RNA から検出した。HRV はコンベンショナル RT-PCR（cRT-PCR）法あるいはリアルタイム RT-PCR 法により検査した。4 種類の HCoV は、リアルタイム RT-PCR 法により検査した。

RS ウイルス（RSV）、ヒトパラインフルエンザウイルス（HPIV）4 種類（1～4 型）、ヒトメタニューモウイルス（hMPV）のは細胞培養でスクリーニングし、遺伝子検査により培養上清由来 RNA から検出した。RSV は HEF 細胞、HEp-2 細胞、RD-18S 細胞、GMK 細胞のいずれかに、HPIV2 および HPIV4 は LLC-MK2 細胞に、hMPV は VeroE6 細胞に細胞変性効果が見られた場合に、cRT-PCR 法により各ウイルスに特異的な遺伝子を検出して同定した。HPIV1 および HPIV3 は LLC-MK2 細胞がモルモット赤血球に吸着を示した場合に各ウイルスに特異的な遺伝子を cRT-PCR 法により検出して同定した。

週毎の検出率（陽性数÷検体数×100）、3 週移動平均（3 週の検出率の和÷3）を算出し、山形県で COVID-19 患者が初確認された 2020 年第 13 週前後で検出状況を比較した。

【結果】呼吸器検体は計 1980 検体（2019-2022 年それぞれ 868, 444, 376, 292 検体）であった。週の平均検体数は県内 COVID-19 発生前、後それぞれ、16.4, 6.8 検体であった。

COVID-19 発生前の 2019 年第 1 週～2020 年第 12 週は 11 種類のウイルスを検出した。2019 年第 1-52 週、2020 年第 1-12 週それぞれ、10 種（HRV, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, 4 種類の HPIV, RSV, hMPV）、8 種（HRV, 4 種類の HCoV, HPIV1, RSV, hMPV）であった。

COVID-19 発生後の 2020 年第 13 週から 2022 年第 44 週は HCoV-229E と HPIV2 を除く 9 種類を検出した。2020 年第 13-53 週、2021 年第 1-52 週、2022 年第 1-44 週それぞれ、2 種類（HRV, HCoV-NL63）、6 種類（HRV, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HPIV3, HPIV4, RSV）、5 種類（HRV, HCoV-HKU1, HPIV1, RSV, hMPV）であった。

【考察】新型コロナウイルスの感染防止策により風邪ウイルスの伝播が減少し、2020 年 13 週以降に検出されるウイルスの種類が減少したと考えられた。ただし、検体数の減少により小さい流行を検出しにくくなる可能性を考慮すべきである。呼吸器ウイルスの流行は 2021 年以降増加してきているが、通常毎年流行する呼吸器ウイルス（HCoV-OC43, HCoV-NL63, HPIV3）が 2022 年は未検出であり、COVID-19 発生前の種類には戻っていない。ウイルスに対する人間の免疫はそれらの流行が途切れることによって低下するため、今後は呼吸器ウイルスの流行拡大を監視していく必要がある。結論として、風邪様症状を起こす呼吸器ウイルスは COVID-19 パンデミック下で流行が激減したが、2021 年以降は戻りつつある各ウイルス感染症の流行の動向に注視していくべきである。

機械学習を用いたインフルエンザウイルスの培養細胞に対する 細胞変性効果の有無の判定

瀬戸順次, 青木洋子, 佐々木美香, 駒林賢一, 水田克巳, 藤原直哉, 昆美也子,
鈴木優子, 大槻りつ子

第49回山形県公衆衛生学会, 2023年3月1日, 於山形

【目的】臨床検体からウイルスを培養する際、ウイルスがもたらす培養細胞の細胞変性効果（CPE）を人の目で見極める必要がある。しかし、CPEの判定には熟練を要する。そのため、本研究では、機械学習を用いたインフルエンザウイルスCPEの自動判定を試みた。

【方法】山形県衛生研究所（山形）でMDCK細胞を用いて培養したインフルエンザウイルスのCPE画像399枚およびインフルエンザウイルス未感染MDCK細胞画像（陰性画像）399枚を用意し、畳み込みニューラルネットワークの代表的なモデルであるResNet18のパラメーターを学習した。この学習されたモデルを用い、新たに撮影したインフルエンザCPE画像78枚（山形38枚、新潟県保健環境科学研究所[新潟]31枚、宮城県保健環境センター[宮城]9枚）および陰性画像92枚（山形56枚、新潟31枚、宮城5枚）におけるCPEの有無を推論した。

【結果】確率0.5以上をCPEと判断した場合、全体のCPE判定の感度は98.7%（CPE画像78枚中77枚正答）、特異度は67.4%（陰性画像92枚中62枚正答）であった。施設別では、山形は感度97.4%/特異度87.5%、新潟は感度100%/特異度35.5%、宮城は感度100%/特異度40.0%であり、新潟と宮城の特異度が低かった。新潟と宮城の陰性画像を培養開始4日目までと5日目以降で分けたところ、特異度は4日目までは64.7%、5日目以降は10.5%であった（ $P<0.01$ ）。新潟では、機材の関係で学習用データの撮影倍率（4倍）とは異なる倍率（10倍）で画像が撮影されていた。

【考察】機械学習によるインフルエンザウイルスCPEの自動判定を試行した結果、3施設に共通して極めて高い感度が得られた。実際の検査では、CPE陽性判定後に遺伝子検査等でインフルエンザウイルスを検出していることを踏まえると、多少の偽陰性が含まれていたとしてもインフルエンザウイルスが増殖している可能性のある検体を選別できる点において、本仕組みは有用であると考えられた。一方、山形以外の2施設で特異度が低くなった点については、まず、山形の環境で撮影した画像を学習用データとして用いたこと、および学習用データと異なる撮影倍率の画像を用いたことによる判定への影響が考えられた。そのため、今後、新潟、宮城においても自施設で学習用データの取り込みや推論を実施可能な環境を整えていく必要がある。また、時間経過とともに劣化していくインフルエンザウイルス未感染MDCK細胞の像がCPEと誤認されている可能性も考えられた。この点に関しては、人の目で観察した場合でも時間経過に伴ってCPEの判定が難しくなることと矛盾しない。そのため、インフルエンザウイルスのCPEが観察され始めることが多い時期（培養開始後3-4日目頃）に培養細胞の観察や画像撮影を重点的におこなう必要があると考えられた。総じて、各地方衛生研究所における機械学習環境の整備および検査体制の改善により本機械学習の感度が維持され、特異度が上昇していくものと推察された。

ヨウシュヤマゴボウに含有される毒性成分の精製及び一斉分析法に関する研究

成田弥生, 篠原秀幸, 長岡由香

第59回全国衛生化学技術協議会年会, 2022年10月31日-11月1日, 於川崎

ヨウシュヤマゴボウは北アメリカ原産の植物で国内に広く分布している。全草に毒性成分フィトラッカサポニンを含んでおり、喫食により腹痛や嘔吐等の消化器症状を呈し、最悪の場合死に至る。フィトラッカサポニンは市販標準品の入手が困難であり、全国でも機器分析による食中毒原因特定や中毒量に関する報告が少ない。これまで本県で発生した食中毒では、機器による毒性成分の分析が行えず、患者への聴き取り調査から食中毒原因を特定していた。

そこで、本研究では、ヨウシュヤマゴボウ食中毒発生時の原因究明を目的としたフィトラッカサポニンの機器分析法を検討した。まず、ヨウシュヤマゴボウに含有される毒性成分のうち、主要成分とされるフィトラッカサポニンB,E,Gの単離精製を試みたところ、当該3成分を純度99%以上で単離した。これらを標準品として、機器分析条件および試料前処理方法を検討し、当該3成分の一斉分析法を確立した。以上のことから、ヨウシュヤマゴボウ食中毒発生時において、機器分析による原因究明が可能と考える。

ツブ貝による有症事例検体の理化学検査

和田章伸, 真田拓生, 佐藤昌宏, 櫻井千優, 長岡由香

第49回山形県公衆衛生学会, 2023年3月1日, 於山形

令和3年に山形県で発生したツブ貝による有症事例検体に含まれる毒性成分を測定した。添加回収試験により妥当性を確認した試験法で試験液を調製し、LC-MS/MSで分析した結果、有症事例検体中のテトラミン含有量は180 mg/kgであった。患者はツブ貝を5～6個喫食したことから、ツブ貝1個当たりの重量を20 gと仮定すると、テトラミンの摂取量は18～29 mgと推定された。既往の文献で報告されている中毒量と比べると、今回の摂取量はやや低かった。その原因として、検体を解凍した際に、水分とともにテトラミンが流出したため、測定値が実際の含有量よりも低くなった可能性が考えられた。